

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

23. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   3 月 2 5 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 0 8 3 9 4 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 0 8 3 9 4 3 ]

出   願   人            株式会社ファンケル  
Applicant(s):

REC'D 13 MAY 2004

WIPO

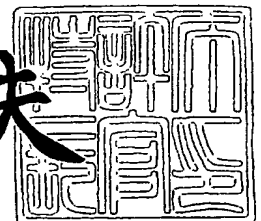
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   4 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PF23-089

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 7/00

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市戸塚区上品濃 1 2 番 1 3 号  
                                株式会社ファンケル中央研究所内

    【氏名】 宮田 智

【特許出願人】

    【識別番号】 593106918

    【氏名又は名称】 株式会社ファンケル

    【代表者】 池森 賢二

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 081397

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 I型コラーゲン及び／又はエラスチン産生促進用組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 シリマリンを含有し I型コラーゲン産生促進及び／又はエラスチン産生促進作用を有することを特徴とする組成物。

【請求項 2】 組成物に含有されるシリマリンが、シリマリン含有植物抽出物及び／又は植物由来である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】 皮膚老化防止用である請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】 皮膚外用である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】 食品である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、ヒト皮膚真皮由来の線維芽細胞（以下ヒト皮膚線維芽細胞）が産生する I型コラーゲン及び／又はエラスチンの産生促進効果を有する組成物に関する。特に本発明は、真皮のはりや弾力性を向上させ、加齢や紫外線照射により引き起こされるしわやたるみなどの皮膚の老化を予防、防止、改善する作用をもつ組成物に関する。

【従来の技術】

しわやたるみなど、皮膚の老化に伴って起こる変化には、加齢、日光曝露などの環境によるストレス、精神的ストレスなどが関与することが知られている。皮膚の老化により、皮膚組織を構成する細胞である表皮細胞、線維芽細胞が減少するとともに、これらの細胞の活動に必要な物質を供給する血管が減少する。また、皮膚構造を保持する機能を持つ細胞外マトリックスにも変化がみられる。顕著な変化として、真皮の I型コラーゲン、III型コラーゲン及びエラスチンや、表皮層と真皮層の間をつなぐ基底膜の IV型コラーゲンやラミニンなどの減少や変性が起こり、表皮、真皮及び基底膜が扁平化する（非特許文献 1）。特に、真皮の主成分である I型コラーゲンやエラスチンは皮膚のはりや弾力性に深く関わっており、これらのタンパク質の変性及び減少が、しわやたるみの主原因となっ

ている。

#### 【0002】

このような皮膚の老化を防止する目的で、様々なコラーゲンやエラスチン産生に着目した製剤が開発されている。例えば、コラーゲン産生促進剤としては、レチノイドとブナ科ブナ属植物の木の芽からの抽出物を含む組成物（特許文献1）、*Saussurea*属に属する植物からの抽出物を含む組成物（特許文献2）、カッコンの抽出物を含む組成物（特許文献3）、セイロンマツリ、ハマスゲの抽出物を含む組成物（特許文献4）、ハス胚芽抽出物を含む組成物（特許文献5）、エピメディウム属に属する植物の抽出物を含む組成物（特許文献6）、月桃からの抽出物を含む組成物（特許文献7）などが開発されている。

#### 【0003】

また、真皮のエラスチンを増加させるための組成物として、エラスチンを配合した化粧料（特許文献8及び9）、エラスチン産生促進剤（特許文献10）及びエラスチン分解酵素であるエラスターゼ阻害剤（特許文献10及び11）などが開発されている。このように、ヒト真皮組織細胞中でI型コラーゲン及び／又はエラスチンの産生が促進されると皮膚の老化が抑制され、しわやたるみが抑制あるいは改善されることが明らかとなっている。

#### 【0004】

また、I型コラーゲン及びエラスチンの産生を促進する成分として、レチノイン酸やその誘導体であるレチノールが知られているが（非特許文献2及び3）、皮膚刺激性を始め、安全性面で問題があること（非特許文献4）や、安定性が悪いことから、一般的な実用には適さない。

#### 【0005】

このように皮膚老化防止を目的とした、真皮のコラーゲン及びエラスチン量を増加させるための組成物が開発されてきたが、皮膚への安全性を兼ね備えつつ、十分に有効な作用を及ぼすには至っていない。

#### 【0006】

本発明は、皮膚老化に関わるヒト皮膚線維芽細胞における、シリマリンの新規な生理効果に基づく発明である。このシリマリンに関する先行技術としては、以

下の非特許文献5及び特許文献12～16が代表的なものであるが、本発明はこれらの先行技術とは異なるものである。

【0007】

【非特許文献1】

化粧品の有効性 評価技術の進歩と将来展望、日本化粧品技術者会編、各論 第1章 第7節 しわ対応化粧品、162～177頁、2001年3月31日 第1刷発行

【非特許文献2】

Varani, J., et al., All-trans retinoic acid stimulates growth and extracellular matrix production in growth-inhibited cultured human skin fibroblasts. J. Invest. Dermatol., Vol. 94, No. 5, p717-723, 1990.

【非特許文献3】

Tajima, S., et al., Elastin expression is up-regulated by retinoic acid but not by retinol in chick embryonic skin fibroblasts, J. Dermatol. Sci., Vol. 15, p166-172, 1997.

【非特許文献4】

Zouboulis, C. C., Retinoids: Is there a New Approach?, IFSCC Magazine, Vol. 3, No. 3, 2000

【非特許文献5】

天然薬物事典、奥田拓男編、廣川書店、昭和61年3月3日 発行

【特許文献1】

特開2001-278783号公報

【特許文献2】

特開 2001-316240 号公報

【特許文献 3】

特開 2001-348338 号公報

【特許文献 4】

特開 2002-29923 号公報

【特許文献 5】

特開 2002-29980 号公報

【特許文献 6】

特開 2002-53427 号公報

【特許文献 7】

特開 2001-316275 号公報

【特許文献 8】

登録 3121957 号

【特許文献 9】

特開 2001-72571 号公報

【特許文献 10】

特開 2002-293747 号公報

【特許文献 11】

特開 2002-205950 号公報

【特許文献 12】

特開平 5-286864 号公報

【特許文献 13】

特許第 2948818 号

【特許文献 14】

特開 2000-169328

【特許文献 15】

特開 2000-169332

【特許文献 16】

特願 2002-255448

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な、ヒト皮膚線維芽細胞のⅠ型コラーゲン及び／又はエラスチンの産生を促進する組成物を提供することを課題とする。さらに又、本発明は、皮膚のはりや弾力性を向上させ、しわやたるみの予防、防止、改善に十分に有効で、かつ、皮膚に対する安全性も高い皮膚老化防止用組成物を、提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者は、Ⅰ型コラーゲン及びエラスチンの産生を促進する作用を有する成分の探索を行った。その結果、シリマリン及び／又はマリアアザミエキスなどのシリマリンを含む植物抽出物、あるいはこれらの植物体がⅠ型コラーゲン及び／又はエラスチンの産生促進に関して優れた作用を有することを見出し、本発明を完成した。

## 【0010】

すなわち、本発明は、

1. シリマリンを含有しⅠ型コラーゲン産生促進及び／又はエラスチン産生促進作用を有することを特徴とする組成物、
  2. 組成物に含有されるシリマリンが、シリマリン含有植物抽出物及び／又は植物由来である前記1に記載の組成物、
  3. 皮膚老化防止用である前記1または2に記載の組成物、
  4. 皮膚外用である前記1～3のいずれかに記載の組成物、
  5. 食品である前記1～3のいずれかに記載の組成物
- に関する。

## 【発明の実施の形態】

## 【0011】

シリマリン (Silymarin; CAS No. 65666-07-1) は、キク科マリアアザミ (学名シリバム・マリアナム *Silibum marianum* Gaertn、別名オオアザミ、オオヒレアザミ、ミルクアザミ; CAS No. 84604-

20-6) から抽出されるフラボノリグナンの総称であり、分子式  $C_{25}H_{22}O_{10}$  で表される、シリビン (Silybin; CAS No. 22888-70-6)、シリジアニン (Silydianin; CAS No. 29782-68-1)、シリクリスチン (Silychristin; CAS No. 33889-69-9)、イソシリビン (Isosilybin; CAS No. 72581-71-6) などを含むしている組成物である (非特許文献 5)。本発明においては、マリアアザミ抽出物に含有されるこれらのフラボノリグナンを含むしている組成物を従来技術と同様、シリマリンと呼ぶ。またシリマリンは前記の通りフラボノリグナンの混合物であり、公知の文献では、シリマリンとしての植物抽出物や植物中の含有量は、前記シリビン換算量で算出されている。本発明においても、上記成分の混合組成物の定量にあたってはシリビンに換算した重量 % で表記する。

#### 【0012】

シリマリンは古くからヨーロッパで肝臓疾患の予防及び治療を目的として使用されている。また、酸化防止剤として広く知られている。皮膚に対して有用な組成物として、乾癬及びアトピー性皮膚炎治療製剤 (特許文献 12)、フラボノリグナンとリン脂質との錯体を活性成分として含み、紅斑、火傷、皮膚または粘膜のジストロフィー状態、皮膚炎等の治療、皮膚の老化防止及び放射線、風、太陽などの外部環境からの刺激保護に有用な組成物 (特許文献 13)、表皮透過バリア強化剤 (特許文献 14)、皮脂分泌抑制剤 (特許文献 15)、表皮の扁平化を予防、防止、改善する皮膚老化防止用組成物 (特許文献 16) などが知られている。しかし、ヒト皮膚線維芽細胞に対する効果は知られていなかった。

#### 【0013】

シリマリンは通常マリアアザミの種実からエタノール抽出し、スプレードライにより乾燥粉末として得られる抽出物原料として市販されている。本発明に使用するシリマリンはこのようにして調製されて、市販されているシリマリンをそのまま用いることができる。また、マリアアザミからシリビン、シリジアニン、シリクリスチン、イソシリビンなどのシリマリンの構成成分を濃縮した抽出物及びそれらを単離、精製して化合物として用いることができる。



## 【0014】

本発明におけるシリマリンを含む植物体は、葉、茎、芽、花、木質部、木皮部（樹皮）などの地上部、根、塊茎などの地下部、種子、樹脂などのすべての部位が使用可能である。

## 【0015】

本発明におけるシリマリン及びそれを含む植物体は、それら自体を乾燥させた乾燥物及びそれらを各種溶媒を用いて溶解した溶解物として使用できる。例えば、水またはエタノール、メタノールなどのアルコール類、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコールなどの多価アルコール、エーテル、アセトン、酢酸エチルなどの有機溶媒を用いて溶解した溶解物として使用できる。

## 【0016】

本発明におけるシリマリンを含む植物体は、天然乾燥、熱風乾燥、凍結乾燥させたり、醗酵させたりしたものをそのまま使用することができる。また植物抽出物を調製する場合は常法に従って、抽出、濃縮、粉末化などの処理を行って得られたものを使用することができる。

## 【0017】

シリマリンを含有する本発明組成物は、真皮の細胞外マトリックスを構成する主要タンパク質であるⅠ型コラーゲン及び／又はエラスチンの産生を促進し、皮膚のはりや弾力性を向上させ、加齢や紫外線照射などにより引き起こされるしわやたるみの形成を予防、防止、改善し、皮膚を若々しく保つことができる。

## 【0018】

本発明におけるシリマリン、シリマリンを含む植物体または植物抽出物を含む組成物は、化粧品などの皮膚外用剤、経口用の食品として製造することができる。

## 【0019】

化粧品としては、シリマリン、シリマリンを含む植物体または植物抽出物を直接または小麦胚芽油あるいはオリーブ油などに添加して、化粧品成分として使用し、化粧料を製造することができる。

## 【0020】

食品としては、シリマリン、またはシリマリンを含む植物体または抽出物を直接、または種々の栄養成分を添加して食品として使用できるし、所望の食品に配合しても良い。例えば、澱粉、乳糖、麦芽糖、植物油脂粉末、カカオ脂末、ステアリン酸などの適当な助剤を添加した後、慣用の手段を用いて、食用に適した形態、例えば、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペーストなどに成形して健康補助食品、保健機能食品などとすることができる。また種々の食品、例えば、ハム、ソーセージなどの食肉加工食品、かまぼこ、ちくわなどの水産加工食品、パン、菓子、バター、粉乳、発酵乳製品に添加してもよく、水、果汁、牛乳、清涼飲料などの飲料に添加して使用してもよい。

#### 【0021】

シリマリン、シリマリンを含む植物体または植物抽出物の組成物への有効配合量は、シリマリン、シリマリンを含む植物または植物抽出物の調製法、製剤の形態などにより、適宜選択、決定され、特に限定されないが、シリピンに換算して0.001～20重量%を含有させることが好ましい。シリマリンを含む植物体または植物抽出物として用いる場合も同様に、シリピンに換算して0.001～20重量%を配合する。通常は、植物体又は植物抽出物を、その乾燥重量としてそれぞれ0.01～60重量%配合することが好ましい。

#### 【0022】

本発明におけるシリマリン、またはシリマリンを含む植物体または抽出物を含む組成物の有効適用量は、適用経路、適用スケジュール、製剤形態などにより、適宜決定することができる。例えば、シリマリン（シリピン換算）を1日当たり0.01g～10gの範囲で適宜調節して、1回または数回に分けて適用できる。また、シリマリンを含む植物体または植物抽出物を含む組成物の場合、乾燥重量として1日当たり0.1g～25gの範囲で適宜調節して、1回または数回に分けて適用できる。

#### 【0023】

本発明の皮膚外用組成物には、適用形態に応じて、適宜、植物油のような油脂類、ワックス等の炭化水素類、高級脂肪酸、高級アルコール、シリコーン、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤、

防腐剤、糖類、金属イオン封鎖剤、水溶性高分子のような高分子、増粘剤、粉体成分、紫外線吸収剤、紫外線遮断剤、ヒアルロン酸のような保湿剤、香料、pH調整剤等を含有させることができる。また、ビタミン類、皮膚賦活剤、血行促進剤、常在菌コントロール剤、活性酸素消去剤、抗炎症剤、美白剤、殺菌剤等の他の薬効成分、生理活性成分を含有させることもできる。

#### 【0024】

油脂類としては、例えばツバキ油、月見草油、マカデミアナッツ油、オリーブ油、ナタネ油、トウモロコシ油、ゴマ油、ホホバ油、胚芽油、小麦胚芽油、トリオクタン酸グリセリン、等の液体油脂、カカオ脂、ヤシ油、硬化ヤシ油、パーム油、パーム核油、モクロウ、モクロウ核油、硬化油、硬化ヒマシ油等の固体油脂、ミツロウ、キャンデリラロウ、綿ロウ、ヌカロウ、ラノリン、酢酸ラノリン、液状ラノリン、サトウキビロウ等のロウ類が挙げられる。

#### 【0025】

炭化水素類としては、例えば、流動パラフィン、スクワレン、スクワラン、マイクロクリスタリンワックス等が挙げられる。

#### 【0026】

高級脂肪酸として、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ドコサヘキサエン酸（DHA）、エイコサペンタエン酸（EPA）等が挙げられる。

#### 【0027】

高級アルコールとして、例えば、ラウリルアルコール、ステアリルアルコール、セチルアルコール、セトステアリルアルコール等の直鎖アルコール、モノステアリルグリセリンエーテル、ラノリンアルコール、コレステロール、フィトステロール、オクチルドデカノール等の分枝鎖アルコール等が挙げられる。

#### 【0028】

シリコーンとして、例えば、鎖状ポリシロキサンジメチルポリシロキサン、メチルフェニルポリシロキサン等、環状ポリシロキサンのデカメチルシクロペンタシロキサン等が挙げられる。

#### 【0029】

アニオン界面活性剤として、例えば、ラウリン酸ナトリウム等の脂肪酸塩、ラウリル硫酸ナトリウム等の高級アルキル硫酸エステル塩、POEラウリル硫酸トリエタノールアミン等のアルキルエーテル硫酸エステル塩、N-アシルサルコシン酸、スルホコハク酸塩、N-アシルアミノ酸塩等が挙げられる。

#### 【0030】

カチオン界面活性剤として、例えば、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム等のアルキルトリメチルアンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等が挙げられる。

#### 【0031】

両性界面活性剤として、例えば、アルキルベタイン、アミドベタイン等のベタイン系界面活性剤等が挙げられる。

#### 【0032】

非イオン界面活性剤として、例えば、ソルビタンモノオレエート等のソルビタン脂肪酸エステル類、硬化ヒマシ油誘導体が挙げられる。

#### 【0033】

防腐剤として、例えば、メチルパラベン、エチルパラベン等を挙げることができる。

#### 【0034】

金属イオン封鎖剤として、例えば、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、エデト酸、エデト酸ナトリウム塩等のエデト酸塩を挙げることができる。

#### 【0035】

高分子として、例えば、アラビアゴム、トラガcantガム、ガラクトン、グアーガム、カラギーナン、ペクチン、寒天、クインスシード、デキストラン、プルラン、カルボキシメチルデンプン、コラーゲン、カゼイン、ゼラチン、メチルセルロース、メチルヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシアセチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC)、アルギン酸ナトリウム、カルボキシビニルポリマー (CARBOPOL等) 等のビニル系高分子、等を挙げることができる。

#### 【0036】

増粘剤として、例えば、カラギーナン、トラガカントガム、クインスシード、カゼイン、デキストリン、ゼラチン、CMC、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシビニルポリマー、グアーガム、キサンタンガム、ベントナイト等を挙げることができる。

#### 【0037】

粉末成分としては、例えば、タルク、カオリン、雲母、シリカ、ゼオライト、ポリエチレン粉末、ポリスチレン粉末、セルロース粉末、無機白色顔料、無機赤色系顔料、酸化チタンコーテッドマイカ、酸化チタンコーテッドタルク、着色酸化チタンコーテッドマイカ等のパール顔料、赤色201号、赤色202号等の有機顔料を挙げることができる。

#### 【0038】

紫外線吸収剤としては、例えば、パラアミノ安息香酸、サリチル酸フェニル、パラメトキシケイ皮酸イソプロピル、パラメトキシケイ皮酸オクチル、2、4-ジヒドロキシベンゾフェノン、等を挙げることができる。

#### 【0039】

紫外線遮断剤として、例えば、酸化チタン、タルク、カルミン、ベントナイト、カオリン、酸化亜鉛等を挙げることができる。

#### 【0040】

保湿剤として、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1，3-ブチレングリコール、1，2-ペンタングリオール、グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、キシリトール、マルチトール、マルトース、ソルビトール、ブドウ糖、果糖、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、ピロリドンカルボン酸、シクロデキストリン等が挙げられる。

#### 【0041】

薬効成分としては、例えば、ビタミンA油、レチノール等のビタミンA類、リボフラビン等のビタミンB<sub>2</sub>類、ピリドキシン塩酸塩等のB<sub>6</sub>類、L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸リン酸エステル、L-アスコルビン酸モノパルミチン酸エステル、L-アスコルビン酸ジパルミチン酸エステル、L-アスコルビン

酸-2-グルコシド等のビタミンC類、パントテン酸カルシウム等のパントテン酸類、ビタミンD<sub>2</sub>、コレカルシフェロール等のビタミンD類； $\alpha$ -トコフェロール、酢酸トコフェロール、ニコチン酸DL- $\alpha$ -トコフェロール等のビタミンE類等のビタミン類を挙げることができる。プラセンタエキス、グルタチオン、ユキノシタ抽出物等の美白剤、ローヤルゼリー、ブナノキエキス等の皮膚賦活剤、カプサイシン、ジンゲロン、カンタリスチンキ、イクタモール、カフェイン、タンニン酸、 $\gamma$ -オリザノール等の血行促進剤、グリチルリチン酸誘導体、グリチルレチン酸誘導体、アズレン等の消炎剤、アルギニン、セリン、ロイシン、トリプトファン等のアミノ酸類、常在菌コントロール剤のマルトースシヨ糖縮合物、塩化リゾチーム等を挙げることができる。さらに、カミツレエキス、パセリエキス、ブナノキエキス、ワイン酵母エキス、グレープフルーツエキス、スイカズラエキス、コメエキス、ブドウエキス、ホップエキス、コメヌカエキス、ビワエキス、オウバクエキス、ヨクイニンエキス、センブリエキス、メリロートエキス、バーチエキス、カンゾウエキス、シャクヤクエキス、サボンソウエキス、ヘチマエキス、トウガラシエキス、レモンエキス、ゲンチアナエキス、シソエキス、アロエエキス、ローズマリーエキス、セージエキス、タイムエキス、茶エキス、海藻エキス、キューカンバーエキス、チョウジエキス、ニンジンエキス、マロニエエキス、ハマメリスエキス、クワエキス等の各種抽出物を挙げることができる。

#### 【0042】

本発明の皮膚外用組成物は、例えば水溶液、油剤、乳液、懸濁液等の液剤、ゲル、クリーム等の半固形剤、粉末、顆粒、カプセル、マイクロカプセル、固形等の固形剤の形態で適用可能である。従来から公知の方法でこれらの形態に調製し、ローション剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏、硬膏、ハップ剤、エアゾール剤、坐剤、注射剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、シロップ剤、トローチ剤等の種々の剤型とすることができる。これらを身体に塗布、貼付、噴霧、飲用等により適用することができる。特にこれら剤型の中で、ローション剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤等の剤型に適している。

#### 【0043】

化粧料としては、化粧水、乳液、クリーム、パック等の皮膚化粧料、メイクアップベースローション、メイクアップクリーム、乳液状又はクリーム状あるいは軟膏型のファンデーションといったメイクアップ化粧料、ハンドクリーム、レッグクリーム、ボディローション等の身体用化粧料、入浴剤等とすることができる。

#### 【0044】

次に、試験例、実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明の効果はこれら試験例、実施例に限定されるものではない。

##### 【試験例】

##### 〔評価試験用化合物溶液の調製〕

生化学用試薬グレードのジメチルスルホキシド (DMSO; 和光純薬)、I型コラーゲン産生促進効果が確認されている陽性対照としてレチノイン酸 (all-trans-レチノイン酸; 和光純薬)、及び陰性対照として大豆レシチン (Soyasaponin; 和光純薬) を使用した。各化合物をDMSOにより溶解した溶液をストック溶液とし、培養液に適当量添加し、細胞に処理した。また同様に、シリマリン (Silymarin group; シグマーアルドリッチ) を上記DMSOにより溶解した溶液をストック溶液とし、培養液に適当量添加し、添加効果を確認した。

#### 【0045】

##### 〔正常ヒト皮膚線維芽細胞の培養〕

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (以下NFB); CCD1059 (大日本製薬より購入) を皮膚線維芽細胞用培地; FGM (三光純薬) で37℃-5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。FGMは、線維芽細胞基礎培地にヒト線維芽細胞増殖因子 (1 µg/ml)、インシュリン (5 mg/ml)、ゲンタマイシン (50 µg/ml)、アンフォテリシンB (50 µg/ml) を添加したものである。本試験には継代数が3~7代の細胞を使用した。

#### 【0046】

##### 〔シリマリンによるI型コラーゲン産生促進作用の評価〕

NFBをFGMで5×10<sup>4</sup>/mlとなるように懸濁調整し、Φ90mm培養

ディッシュに10mlずつ播種し、70%コンフルエント状態になるまで培養した。各化合物を各濃度で添加したFGMを10ml/ディッシュで処理し、24時間培養した。培養上清液を回収し、150G、5分間遠心して浮遊細胞を除去した後、12,000G、30分間遠心して細胞片を除去した。80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して4℃で一晩攪拌した。15,000G、30分間遠心してタンパク質を沈降させ、上清を除去後、20mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解した。20mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で、4℃で一晩透析後、20倍濃縮になるように20mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え、ウェスタンブロッティング用サンプルとして用いた。

#### 【0047】

サンプル中のタンパク質をSDS-PAGEで分離後、ニトロセルロース膜に転写した。転写後のニトロセルロース膜をブロッキング溶液（スキムミルクを5%の濃度になるように0.1%のポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを含むPBSで溶解した溶液）に浸し、4℃で一昼夜ブロッキングした。洗浄液 {0.1%のポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを含むPBS} で洗浄後、一次抗体 {洗浄液で500ng/mlに調製したI型コラーゲンに対するポリクローナル抗体（ロックランド）} に浸し、室温で1時間反応させた。洗浄後、二次抗体（洗浄液で250ng/mlに調製したホースラディッシュパーオキシダーゼ標識化抗ウサギイムノグロブリンG）に浸し、室温で1時間反応させた。洗浄後、ECLプラスウェスタンブロッティング検出試薬（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて検出した。また、検出されたバンドをイメージスキャナー（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて取り込み後、イメージマスターソフトウェアにより解析し、数値化した。

#### 【0048】

ウェスタンブロッティングによる各化合物のI型コラーゲン産生促進作用の測定結果を図1に示す。また、完全長のI型コラーゲン（図1中で、I型コラーゲンと表記したバンド）に関して画像解析により数値化した結果を表1に示す。



【表1】

【表1】

薬剤	処理濃度	対無処理対照比
無処理対照	—	1. 0
レチノイン酸	250 nM	2. 0
レチノイン酸	500 nM	1. 4
シリマリン	1 $\mu$ g/ml	0. 9
シリマリン	5 $\mu$ g/ml	1. 8
シリマリン	10 $\mu$ g/ml	3. 4
大豆レシチン	10 $\mu$ g/ml	0. 9

## 【0049】

シリマリンを5及び10  $\mu$ g/mlで処理した時には、無処理対照に比べてI型コラーゲン産生がそれぞれ1. 8倍及び3. 4倍に促進された。陽性対照として、レチノイン酸を250 nM及び500 nMで処理した時には、無処理対照に比べてI型コラーゲン産生がそれぞれ2. 0倍及び1. 4倍に促進された。一方、陰性対照として、大豆レシチンを10  $\mu$ g/mlで処理した時には、無処理対照と同程度であった。このことから、シリマリンはヒト皮膚線維芽細胞のI型コラーゲン産生を顕著に促進することが明らかになった。

## 【0050】

[シリマリンによるエラスチン産生促進作用の評価]

NFBをFGMで $5 \times 10^4$ /mlとなるように懸濁調整し、 $\Phi 90$  mm培養ディッシュに10 mlずつ播種し、70%コンフルエント状態になるまで培養した。各化合物を各濃度で添加したFGMを10 ml/ディッシュで処理し、24時間培養した。培養上清液を回収し、150 G、5分間遠心して浮遊細胞を除去した後、12,000 G、30分間遠心して細胞片を除去した。80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して4℃で一晩攪拌した。15,000 G、30分間遠心してタンパク質を沈降させ、上清を除去後、20 mM Tris-H

C1 (pH 7.5) に溶解した。20mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で、4℃で一晩透析後、20倍濃縮になるように20mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え、ウエスタンブロッティング用サンプルとして用いた。

#### 【0051】

サンプル中のタンパク質をSDS-PAGEで分離後、ニトロセルロース膜に転写した。転写後のニトロセルロース膜をブロッキング溶液（スキムミルクを5%の濃度になるように0.1%のポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを含むPBSで溶解した溶液）に浸し、4℃で一昼夜ブロッキングした。洗浄液 {0.1%のポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレートを含むPBS} で洗浄後、一次抗体 {洗浄液で500 ng/ml に調製したエラスチンに対するモノクローナル抗体（ケミコン社）} に浸し、室温で1時間反応させた。洗浄後、二次抗体（洗浄液で250 ng/ml に調製したホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識化抗マウスイムノグロブリンG）に浸し、室温で1時間反応させた。洗浄後、ECLプラスウエスタンブロッティング検出試薬（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて検出した。また、検出されたバンドをイメージスキャナー（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて取り込み後、イメージマスターソフトウェアにより解析し、数値化した。

#### 【0052】

ウエスタンブロッティングによる各化合物のエラスチン産生促進作用の測定結果を図2に示す。また、完全長のエラスチン（図2中で、エラスチンと標記したバンド）に関して、画像解析により数値化した結果を表2に示す。

【表 2】

【表 2】

薬剤	処理濃度	対無処理対照比
無処理対照	—	1. 0
レチノイン酸	250 nM	2. 8
レチノイン酸	500 nM	1. 4
シリマリン	1 $\mu$ g/ml	0. 9
シリマリン	5 $\mu$ g/ml	1. 1
シリマリン	10 $\mu$ g/ml	4. 7
大豆レシチン	10 $\mu$ g/ml	1. 1

## 【0053】

シリマリン 10  $\mu$ g/ml の濃度で細胞を処理した時には、無処理対照に比べてエラスチン産生が 4. 7 倍に促進された。陽性対照として、レチノイン酸を 250 nM 及び 500 nM の濃度で細胞を処理した時には、無処理対照に比べてエラスチン産生がそれぞれ 2. 8 倍及び 1. 4 倍に促進された。一方、陰性対照として大豆レシチンを 10  $\mu$ g/ml 濃度で細胞を処理した時には、無処理対照と同程度であった。このことから、シリマリンがヒト皮膚線維芽細胞のエラスチン産生を顕著に促進することが明らかになった。

## 【0054】

## [マリアアザミエキスの安全性評価]

マリアアザミは、ヨーロッパにおいては古くから食品や薬用に用いられており、その安全性は熟知されている。今回、このマリアアザミエキスの皮膚刺激性について試験を行った。

## 【0055】

1%シリマリン含有マリアアザミエキスの皮膚刺激性について、ヒトパッチテスト法を用いて評価した。1%シリマリン含有マリアアザミエキスを配合したワセリンをパッチ絆に適用し、被験者の上腕内側部に 24 時間閉塞貼付した。パッ

チ絆除去3及び24時間後に適用部位を観察し、日本接触皮膚炎学会の本邦基準に従い判定した。被験者20人により評価した結果、全員陰性で、皮膚安全性の高いことが明らかになった。

### 【0056】

#### 【実施例】

以下に、本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例1】 クリーム

下記の処方（単位は重量％）により、クリームを製造した。

(1) ステアリルアルコール	6.0
(2) ステアリン酸	2.0
(3) 水添ラノリン	4.0
(4) スクワラン	9.0
(5) オクチルドデカノール	10.0
(6) POE (25) セチルアルコールエーテル	3.0
(7) モノステアリン酸グリセリン	2.0
(8) シリマリン	0.1
(9) 防腐剤	適量
(10) 香料	適量
(11) 1、3 ブチレングリコール	6.0
(12) PEG1500	4.0
(13) 精製水	残余

〔製法〕上記成分(1)～(10)を80℃に加熱溶解し油相とする。成分(11)～(13)を70℃に加熱溶解し水相とする。油相に水相を徐々に加え乳化し、攪拌しながら40℃まで冷却し、さらに30℃まで攪拌冷却してクリームを得た。

#### 【実施例2】 錠剤

下記の処方（単位は重量％）により、錠剤を製造した。

(1) シリマリン	20.0
-----------	------

- |             |      |
|-------------|------|
| (2) 乳糖      | 65.0 |
| (3) コーンスターチ | 14.0 |
| (4) グアーガム   | 1.0  |

**【0057】****【発明の効果】**

以上に説明したように、シリマリン、シリマリンを含む植物または植物抽出物を含む本発明の組成物は、ヒト真皮のⅠ型コラーゲン及びエラスチンの産生を促進する。その結果、皮膚のはりや弾力性を向上させ、しわ、たるみのない若々しい肌の状態を維持することができる。

**【0058】****【図面の簡単な説明】**

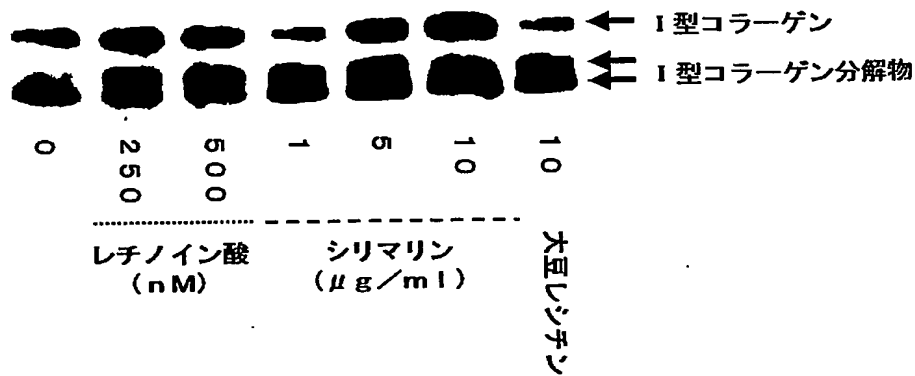
【図1】 シリマリンによる皮膚線維芽細胞におけるⅠ型コラーゲンの産生促進作用を示す図である。

【図2】 シリマリンによる皮膚線維芽細胞におけるエラスチンの産生促進作用を示す図である。

【書類名】 図面

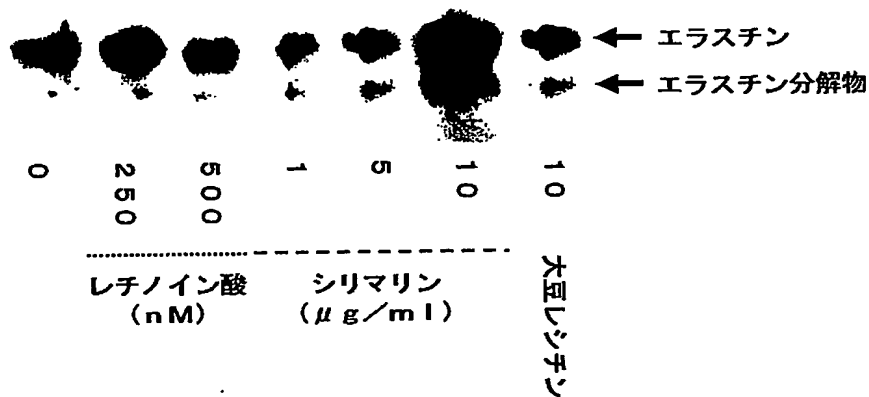
【図 1】

【図 1】



【図 2】

【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト皮膚線維芽細胞の I 型コラーゲン及び／又はエラスチンの産生を促進する組成物を提供することにより、皮膚のはりや弾力性を向上させ、しわやたるみの予防、防止、改善に十分に有効で、かつ、皮膚に対する安全性も高い皮膚老化防止用組成物を提供すること。

【解決手段】 本発明は、シリビン、シリジアニン、シリクリスチン、イソシリビンなどのフラボノリグナンの総称であるシリマリンを含有し、I 型コラーゲン産生促進及び／又はエラスチン産生促進作用を有することを特徴とする組成物、組成物に含まれるシリマリンがシリマリン含有植物抽出物及び／又は植物由来であり、I 型コラーゲン産生促進及び／又はエラスチン産生促進作用を有することを特徴とする組成物である。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-083943
受付番号	50300485470
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 3月26日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 3月25日
-------	-------------

次頁無



特願 2 0 0 3 - 0 8 3 9 4 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 3 1 0 6 9 1 8 ]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 5 月 1 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県横浜市栄区飯島町 1 0 9 番地 1

氏 名

株式会社ファンケル